



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

BEATRIZ TEIXEIRA RODRIGUES

**A IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS T REGULADORAS NO CONTROLE DA
AUTOIMUNIDADE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado em formato de artigo científico ao UniCEUB como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof. Dra. Kelly Cristina Rodrigues Simi.

Brasília
2019

A importância das células T reguladoras no controle da autoimunidade

Beatriz Teixeira Rodrigues ¹
Kelly Cristina Rodrigues Simi ²

Resumo: A saúde fisiológica deve equilibrar a capacidade da resposta imune contra patógenos e a tolerância a componentes próprios e comensais, garantindo sua integridade. A quebra desse equilíbrio provoca doenças autoimunes ou inflamação crônica em caso de resposta imune excessiva. A pouco mais de 20 anos as células T reguladoras ressurgem como células capazes de suprimir a resposta imune em determinadas condições, estas representam uma subpopulação de células T que contém capacidade para induzir supressão de células T efectoras, apresentando assim função essencial no mecanismo de tolerância imunológica. Além disso demonstram enorme potencial terapêutico ao revelarem a possibilidade de se obter supressão antígeno específico evitando dessa forma o risco de imunossupressão sistêmica, contudo, ainda há aspectos que precisam ser melhor analisados, sendo crucial a realização de estudos que possibilitem a avaliação da manipulação das células T reguladoras em humanos, bem como estabelecer que condições podem influenciar o seu desempenho e por conseguinte sua viabilidade. Posto isso, o seguinte trabalho foi realizado a partir de uma revisão narrativa da literatura onde o objetivo foi apresentar os mecanismos de supressão dessas células e seu papel na auto-tolerância, bem como demonstrar o potencial de manipulação dessas células para fins terapêuticos.

Palavras-chave: Células T reguladoras (Tregs). Autoimunidade. Tolerância imunológica. Foxp3. Regulação da autoimunidade.

The importance of regulatory t cells in the control of autoimmunity

Abstract: The physiological health must balance the capacity of the immune reply against pathogens and the tolerance the proper and you start components, guaranteeing its integrity. The balance in addition provokes illnesses autoimmune or chronic inflammation in case of extreme immune reply. Little more than the 20 years regulating cells T resurge as cells capable to suppress the immune reply in definitive conditions, these represent a subpopulation of cells T that contains capacity to induce suppression of effector cells T, thus presenting essential function in the mechanism of immunological tolerance. Moreover they demonstrate to enormous therapy potential when disclosing the possibility of if to get suppression specific antigen preventing of this form the risk of systemic immunosuppression, however, still has aspects that they more good need to be analyzed, being crucial the accomplishment of studies that make possible the evaluation of the manipulation of regulating cells T in human beings, as well as establishing that conditions can influence its performance and therefore its viability. Rank this, the following work was carried through from a revision narrative of literature where the objective was to present the mechanisms of suppression of these cells e its paper in the auto-tolerance, as well as demonstrating the potential of manipulation of these cells for therapeutical ends.

Keywords: Regulatory T cells (Tregs). Autoimmunity. Immunological tolerance. Foxp3. Regulation of autoimmunity.

¹ Acadêmica de Biomedicina do UniCEUB

² Professora do UniCEUB

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune é uma rede de defesa constituída por células, tecidos, moléculas e órgãos e possui como principal função a proteção do organismo contra agentes externos, sendo encarregado da preservação de sua integridade, além de minimizar a inflamação deletéria causada por respostas imunes contra antígenos autólogos, microrganismos comensais e distúrbios inflamatórios metabólicos (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012). A capacidade do sistema imunológico de discriminar entre antígenos próprios e não-próprios culmina em tolerância imunológica, a qual é resultante do reconhecimento de antígenos específicos por linfócitos durante sua fase de desenvolvimento, sendo caracterizada pela falta de responsividade a determinadas moléculas, a qual é mantida por mecanismos centrais e periféricos (BACCHETTA; GREGORI; RONCAROLO, 2005).

O mecanismo central ocorre no timo, durante a maturação dos linfócitos, sendo caracterizada por deleção clonal, neste processo ocorre a eliminação de linfócitos que possuem alta afinidade por antígenos próprios, mecanismo este denominado de “seleção negativa”. No entanto, algumas dessas células podem se desenvolver em células reguladoras, ou escapar a este mecanismo, por apresentarem afinidade intermediária por auto-antígenos, podendo migrar até à periferia. Sendo assim é essencial a operação dos mecanismos de tolerância periférica, por sua vez este ocorre através de três métodos principais: morte induzida por ativação (apoptose); inativação através do processo de anergia, tornando-as não responsivas ao antígeno, ou supressão por intermédio das células T reguladoras (Tregs). A falha ou colapso desses mecanismos responsáveis pela manutenção da autotolerância podem resultar em processo autoimune, caracterizado pelo desenvolvimento de uma resposta imune direcionada a componentes autólogos do organismo humano saudável (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015; LA CAVA, 2008).

As doenças autoimunes englobam um grande espectro de patologias, cuja incidência vem aumentando nos últimos anos, em países desenvolvidos estima-se que aproximadamente 5% da população apresente uma ou mais dessas condições. A origem das doenças autoimunes ainda é discutida, uma hipótese envolve uma falha na tolerância central e periférica, sendo esta última associada a um número de Treg reduzido ou a falhas na sua função. Essas doenças geram repercussões tanto no nível de morbidade e mortalidade quanto no nível socioeconómico, em virtude da cronicidade dessas patologias, que dispõe apenas de tratamentos paliativos (TOBON; YOUINOU; SARAUX, 2010; PARHAM, 2011).

O interesse nas células T reguladoras ressurgiu no ano de 1995 quando descritas por Sakaguchi et al. como tendo função na manutenção dos mecanismos de autotolerância e regulação da resposta imune, posto que estas induzem a supressão de células T efectoras, bloqueando sua ativação e função. Tem sido demonstrado que tanto a remoção quanto a interferência no desenvolvimento dessas células resultam em alterações que induzem patologias autoimunes e inflamatórias (SCHMETTERER; NEUNKIRCHNER; PICKL, 2012; ARAUJO et al., 2008). Existe grande variedade de células Treg, porém, as mais estudadas e com maior destaque e importância a nível fisiológico são as Tregs $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ (SAKAGUCHI, 2006). As células Treg constituem uma subpopulação de linfócitos T, que detém a habilidade de induzir supressão das células T efectoras em resposta a presença de autoantígenos, estas representam 5% a 10% do total de células T $CD4^+$, são geradas na medula óssea e maturadas no timo, podendo ser encontradas nos órgãos linfoides secundários e no sangue periférico (ARAUJO et al., 2008; LA CAVA, 2008; TAAMS et al., 2002).

A supressão por intermédio das células T reguladoras serve como um mecanismo vital de regulação negativa da inflamação, mediada pelo sistema imune, e caracteriza-se de forma importante em distúrbios autoimunes (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012). Estudos demonstram que a maioria das doenças autoimunes como diabetes tipo 1, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, miastenia gravis, artrite reumatoide e outras, apresentam defeitos no número ou na função das células Treg no sangue periférico (VILLAR; HAFNER, 2018).

O sistema imune atribui grande papel na proteção do organismo e prevenção de patologias, sendo essencial na manutenção da homeostase. Entretanto, sob condições ainda não entendidas em sua totalidade, pode haver descontinuação da tolerância imunológica resultando em uma excessiva resposta imune que, ao atacar tecidos próprios, é capaz de gerar processo patológico (ROMAGNANI, 2006). A elaboração de novos tratamentos e identificação de possíveis alvos terapêuticos foi possível graças aos recentes avanços obtidos na área imunológica e de biologia molecular, que foram essenciais para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos das doenças autoimunes. As células T reguladoras apresentam um enorme potencial terapêutico ao demonstrarem a possível capacidade de alcançar supressão antígeno-específica, evitando assim os riscos de imunossupressão sistêmica, entretanto ainda existem diversos aspectos que precisam ser entendidos (BLUESTONNE et al., 2015).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi apresentar os mecanismos biológicos de supressão dessas células e sua eficiência no controle de processos autoimunes discutindo seu papel na autotolerância e na homeostase imunológica. Além disso outros aspectos são

mencionados, incluindo terapia imunomoduladora com a indução de sinais inibitórios usando Tregs, abordando o potencial de manipulação dessas células para fins terapêuticos como uma forma atraente de tratamento de doenças autoimunes. A compreensão do importante papel dessas células no equilíbrio homeostático regulatório nos ajuda a perceber as disfunções geradas pela ausência dessas células no organismo.

2. METODOLOGIA

A metodologia utilizada para o desenvolvimento do estudo em questão foi realizada por meio de uma revisão narrativa bibliográfica, que foi produzida mediante conteúdo já elaborado, fundamentado em livros e artigos científicos.

Partindo desse princípio foram utilizados materiais que apresentaram conteúdos vinculados às células T reguladoras, seu papel e função no sistema imune, bem como avanços científicos sobre o tema em questão, obtidos em livros do acervo de bibliotecas e nas bases de dados Scielo, Google Acadêmico e Pubmed publicados nos últimos 10 anos (2008 a 2018), porém trabalhos anteriores a esse período foram utilizados considerando sua relevância para a pesquisa. A pesquisa foi realizada em idiomas inglês e português com as palavras-chave: células T reguladoras (Tregs), autoimunidade, tolerância imunológica, Foxp3, regulação da autoimunidade e imunoterapia Treg.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Células Treg – características fenotípicas e função

As células T reguladoras antes conhecidas como T supressoras ressurgiram no final da década de 1990, quando diversas subpopulações de células T foram reconhecidas como tendo capacidade de inibir a proliferação de outras células (NAGLER et al, 2004). Mais de 20 anos após sua “redescoberta”, as Treg apareceram como um elemento essencial para a compreensão dos mecanismos de tolerância periférica que controlam o desenvolvimento de doenças autoimunes e alergias (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003).

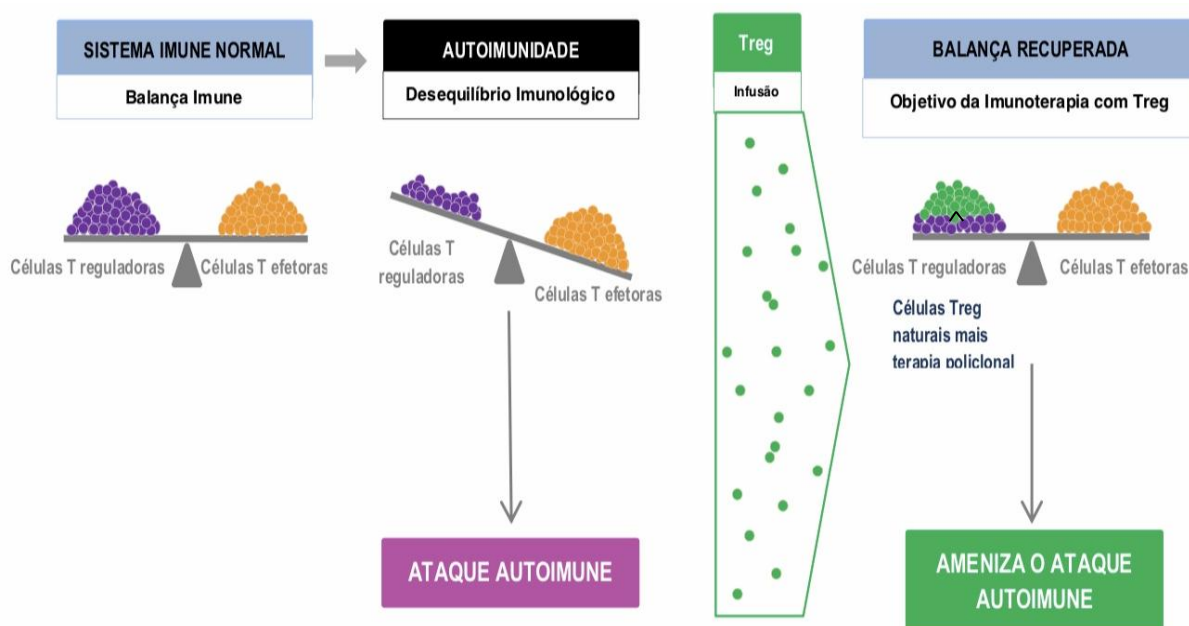
Tem se observado grande progresso na compreensão dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na geração de células T reguladoras, sua função na homeostase imunológica, inflamação e autoimunidade, e seu possível papel terapêutico em doenças autoimunes (GUPTA, 2008). Essas células compreendem uma linhagem distinta de células T CD4 que expressa altos níveis de CD25 e apresenta o fator de transcrição Foxp3, esta subpopulação é primordialmente desenvolvida no timo e pode ser induzida periféricamente (PARHAM, 2011; LIMA, 2006).

No timo algumas células T CD4⁺ comprometidas, que reconhecem autoantígenos com grande avides, podem ser eliminadas por seleção negativa ou se desenvolver em células T reguladoras, denominadas como células T reguladoras tímicas ou naturais (tTreg), sendo específicas para antígenos próprios, pois estes são principalmente encontrados no timo. Por sua vez nos tecidos linfoides periféricos, linfócitos T naive na presença de determinados estímulos antigênicos favorece a geração de células Treg, podendo ser induzidas *in vivo* periféricamente (pTreg) como *ex vivo* (iTreg). As células T reguladoras geradas periféricamente são conhecidas como Treg adaptativas ou induzidas, estas podem ser específicas para antígenos externos ou autoantígenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Essas células T CD4 auto-reativas com atribuição imunoreguladora tem como função primordial suprimir a ativação de células T CD4 e T CD8 auto-reativas imaturas potencialmente nocivas para tecidos saudáveis (PARHAM, 2010).

A saúde fisiológica requer um equilíbrio entre responsividade imunológica contra agentes patogênicos e tolerância a componentes próprios e comensais. O sistema imune deve assegurar este equilíbrio homeostático, posto que a descontinuidade deste fenômeno pode acarretar doenças autoimunes e/ou inflamação crônica em virtude de uma resposta imune excessiva (LONG; BUCKNER, 2011).

A autotolerância periférica e a homeostase imune são mantidas, pelo menos em parte, pelo equilíbrio entre Treg e células T efetoras (figura 1). As células T reguladoras auxiliam no controle da resposta imune para que esta não seja exacerbada, por outro lado, a atuação excessiva das células Treg pode reduzir a magnitude da resposta imune, o que pode suceder a um controle ineficaz de um processo infeccioso por exemplo. Assim como o excesso da atividade das Treg pode afetar a homeostase, a ausência dessas células também culminam no desequilíbrio da estabilidade imunológica, podendo desencadear processo autoimune. Com isso pode-se determinar a ideia de que ambas devem coexistir em um delicado equilíbrio para manutenção da homeostase imunológica (LIMA, 2006; SAKAGUCHI; WING; YAMAGUCHI, 2009). A quantidade reduzida de Tregs ou sua disfunção está relacionada a diversas doenças autoimunes, assim sendo, notavelmente apresentam potencial para elaboração de imunoterapias com o objetivo de reestabelecer a tolerância imune em pacientes que apresentam distúrbios autoimunes (LONG; BUCKNER, 2011).

Figura 1. A manutenção da tolerância imunológica é dependente do balanço entre células Treg e células T efectoras.



Fonte: Adaptada de JDRF, 2014.

As células T reguladoras apresentam fenótipos diferentes de outras subpopulações de linfócitos, em camundongos e humanos, podem ser diferenciadas de outras células T CD4 principalmente pela expressão de altos níveis de CD25 (cadeia- α do receptor de IL-2) e expressão do fator nuclear de transcrição Foxp3, responsável em grande parte por conduzir sua diferenciação, sendo que ambos são fundamentais para o desenvolvimento, desempenho e manutenção dessas células. Além disso, utilizam IL-2 como fator de crescimento, ao contrário das células T virgens e efectoras que utilizam o fator IL-7 (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; YAGI et al., 2004).

3.1.1 Treg derivadas do timo

O timo normal gera células T auto-reativas potencialmente patogênicas bem como concebe células T reguladoras maduras, que quando na periferia exercem controle dominante sobre as células T auto-reativas. A deficiência de Treg na periferia é suficiente para evocar autoimunidade mediada por células T auto-reativas (SAKAGUCHI et al, 2008). Além disso, de acordo com Singh et al. (2001), o esgotamento de Treg natural não só provoca autoimunidade mas também gera uma exacerbada resposta imune a antígenos não próprios levando a, por exemplo, uma doença inflamatória intestinal ocasionada possivelmente por resposta imune excessiva a bactérias comensais do intestino.

Experimentos realizados por Sakaguchi et al. (1982) demonstraram que timectomia neonatal de espécimes de camundongos no 3º dia após o nascimento resultaram em lesões autoimunes de diversos órgãos, tais como tireoide, estômago, ovários e testículos. Além disso também foi observado que timectomia em camundongos adultos saudáveis seguidos por sessões de raio-X gerou tireoidite autoimune e diabetes tipo I.

Determinar um marcador específico capaz de diferenciar esta subpopulação de células tem sido um grande desafio. A princípio a molécula CD25 foi considerada um marcador funcional útil na identificação de células T reguladoras, contudo esta também é expressa em linfócitos T efetores ativados (em níveis mais baixos). No entanto este marcador tem sido utilizado juntamente com um conjunto de marcadores de superfície, também expressos em outras células, mas que por outro lado contribuem na identificação dessa população celular, conforme descrito na tabela 1. A molécula CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) é um receptor expresso em elevados níveis que atua como mediador da função supressiva das Treg, estimulando e aumentando a sua capacidade supressora (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Segundo Walker (2013) CTLA-4 e Tregs representam mecanismos complementares e amplamente sobrepostos de tolerância imunológica. A partir de resultados obtidos em estudo realizado em pacientes com melanoma metastizado tratados com anti-CTLA-4 humanizado levou a acreditar que o bloqueio dessa molécula possa afetar a funcionalidade das células T reguladoras, posto que 20% dos pacientes tratados com essa terapêutica apresentaram desenvolvimento de patologias autoimunes (READ et al., 2006).

O receptor GITR (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) é outro marcador encontrado nas células T reguladoras. Em diversos estudos foi tido como regulador negativo da função dessas células, porém recentemente estudos tem demonstrado que a falta da expressão de GITR poderá colaborar para o desencadeamento de processo autoimune (PETRILLO et al., 2015; LIAO et al., 2010). Outros marcadores também podem ser identificados nas células Treg, tais como COLO (peptídeo associado a latência), ICOS (co-estimulador de células indutíveis, CD278), CD28 (co-estimulador necessário para ativação de células T), CD44 (Receptor de ácido hialurônico), entre outros (SINGER et al, 2014). O fator de transcrição Foxp3 (forkhead transcription factor 3) é majoritariamente expresso em células CD4⁺ CD25⁺ em humanos, e sua identificação possibilitou uma melhor caracterização dessas células (MELLANBY; THOMAS; LAMB, 2009).

Tabela 1. Marcadores relevantes para identificação da população de células T reguladoras.

Marcador	Nome	Função	Relevância para imunoterapia Treg
Foxp3	Forkhead Transcription Factor 3	Fator de transcrição regulador do desenvolvimento e função Treg	Identifica a linhagem Treg em camundongos; expresso em Tregs CD4+
CTLA-4	Antígeno de linfócito citotóxico, CD125	Transmite sinal inibitório para APC's (células apresentadoras de antígenos)	Mecanismo importante da função supressora de Treg
GIRT	Membro da família do receptor do fator de necrose tumoral 18 (TNFRS18)	Sinalização células	Mecanismo importante da função supressora de Treg
LAG-3	Gene de ativação de linfócitos 3 CD233 (grupo de diferenciação 233)	Homólogo de CD4 com propriedades de ligação ao MHC de classe II	Expresso em Tregs
CD3	Complexo co-receptor TCR	Transdução de sinal de TCR	Estimulação necessária para expansão Treg
CD4		Interage com moléculas de MHC de classe II em APC's e amplifica os sinais de TCR	Identifica o subconjunto de linfócitos CD4+
CD25	Corrente α do receptor de IL-2 (interleucina 2)	Componente do receptor de IL-2	Expresso por CD4+ Foxp3+ Tregs, mas também por outras células T
CD45RO	Antígeno comum de leucócitos (isoforma RO)	Proteína fosfatase receptor, C	Marcador Treg positivo, também identifica Células T de memória
CD45RA	Antígeno comum de leucócitos (isoforma RA)	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor, C	Marcador Treg menor, também identifica células T virgens

Legenda: APC's: células apresentadoras de antígenos; CD: grupo de diferenciação; IL: interleucina; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; TCR: receptor de células T. Fonte: Adaptado de SINGER et al., 2014.

3.1.2 Tregs induzidas periféricamente

As células Treg induzidas ou adaptativas também dispõem função supressora e apresentam semelhanças com as Tregs naturais/tímicas, entretanto originam-se em órgãos linfoides periféricos, na presença de estímulo antigénico ou em condições ditas tolerogênicas, a partir de células T naïve ($CD4^+ CD25^-$). Sob determinadas condições possuem capacidade de serem geradas *ex vivo* a partir de células T $CD4^+ CD25^- Foxp3^-$ (DONS et al., 2012; BACCHETTA; GAMBINERI; RONCAROLO, 2007; TAAMS et al., 2006). Estas, por sua vez, executam sua função por intermédio de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β (JONULEIT; SCHMITT, 2003; SAKAGUCHI, 2006).

3.2 Foxp3 e sua função no desenvolvimento das células T reguladoras

Foi constatado que as células T reguladoras tímicas e periféricas expressam majoritariamente o gene regulador Foxp3, um fator de transcrição a qual executa suas funções mediante trechos específicos no DNA aumentando ou suprimindo a transcrição de genes específicos, este possui 11 éxons e encontra-se no braço curto (p) do cromossomo X, (Xp11.23), e sintetiza uma cadeia polipeptídica de 431 aminoácidos (ARAUJO et al., 2008; KHATTRI et al., 2003; TORGERSON; OCHS, 2007).

A relevância do fator de transcrição Foxp3 no desenvolvimento das células T reguladoras foi estipulada a contar da identificação de uma mutação do tipo frameship no gene FOXP3 observada no estudo de Brunkow et al. (2001), a qual é desencadeadora do fenótipo de camundongos *scurfy*, uma mutação recessiva, ligada ao X que manifesta distúrbios autoimunes significativos com depleção completa de células T reguladoras e óbito precoce. Em humanos mutações no gene Foxp3 ocasionam ausência das células T reguladoras culminando em uma rara doença autoimune denominada IPEX (síndrome de desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X), a qual caracteriza-se por patologia autoimune que prejudica múltiplos órgãos (ARAUJO et al, 2008; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

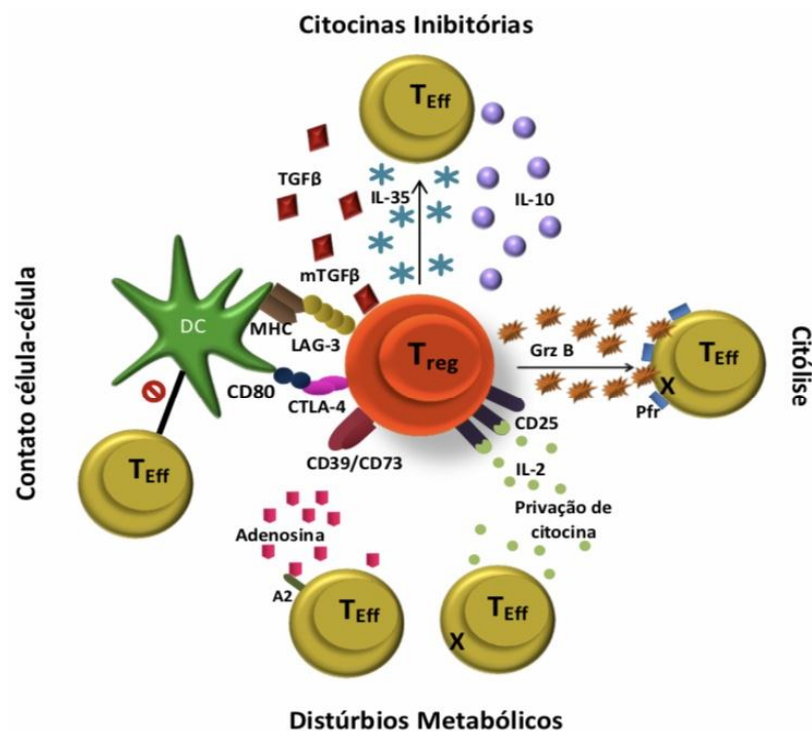
O fator de transcrição FOXP3 possui funções relacionadas a regulação e desenvolvimento das Tregs, a perda de expressão de Foxp3 reduz a eficiência supressora dessas células. A expressão desse fator de transcrição é regulada por diversos mecanismos, células T $CD4^+ CD25^-$ naïve induzidas a expressar o gene Foxp3 tornam-se anérgicas passando a desempenhar mecanismos supressores *ex vivo* (ARAUJO et al, 2008; CHEN; OPPENHEIM, 2011; HOFFMANN et al., 2009; TONE; GREENE, 2011).

3.3 Mecanismo de ação das células T reguladoras

Esta subpopulação celular exerce sua função através de um conjunto complexo de artifícios regulatórios determinados a garantir a modulação da resposta imune diante os inúmeros antígenos oriundos de agentes infecciosos, auto-antígenos, tumores, alérgenos e aloantígenos (ARAUJO et al; 2008).

Vem sendo descritos diversos mecanismos diretos e indiretos de supressão que as células T reguladoras podem exercer sobre células T efetoras, conforme exposto na figura 2, dentre eles: contato célula-célula com auxílio da co-estimulação da via de expressão do CTLA-4, inibindo a habilidade de estimulação das APC's (células apresentadoras de antígeno) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015; BACCHETTA; GREGORI S; RONCAROLO, 2005); supressão mediada por citocinas inibitórias, que afetam as células T, como fator de transformação e crescimento ($TGF-\beta$), IL-10, IL-35; indução de apoptose por distúrbio metabólico através do consumo de IL-2 (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015) e supressão por meio de adenosina (BORSEELLINO et al., 2007). Além disso, essas células dispõem da liberação de granzima e perforina, que danificam a membrana da célula-alvo levando à apoptose (SINGER et al., 2014).

Figura 2. Mecanismo básicos de ação utilizados pelas células T reguladoras.



Fonte: Adaptado de WORKMAN et al, 2009.

3.3.1 Citocinas inibitórias:

A interação entre células através de citocinas inibitórias tem como principais elementos o TGF- β , IL-35 e IL-10, estas apresentam importante capacidade imunoreguladora, controlando a geração de citocinas inflamatórias pelas APCs, tais como, TNF- α , IL-2 ou INF- γ (SCHMITT; WILLIAMS, 2013; READ; POWRIE, 2001). O TGF- β atua através da inibição de respostas imunológicas e inflamatórias por meio da supressão da ativação de neutrófilos, macrófagos e células endoteliais. Fora sua atribuição supressora também exerce função na estimulação da expressão de Foxp3, o fator de transcrição que leva a diferenciação de linfócitos T para a linhagem reguladora (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A IL-35 recentemente foi reconhecida como tendo possíveis ações na função reguladora das Tregs, agindo na regulação das células T efectoras e na indução de Foxp3 culminando na expansão de Tregs (SCHMITT; WILLIAMS, 2013; SHEVACH, 2009). Por sua vez a IL-10 tem como principal função a inibição de APCs, macrófagos e células dendríticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

3.3.2 Citólise (*granzima B e perforina*)

Este mecanismo requer a presença de moléculas citolíticas, tendo em vista que as células T reguladoras CD4⁺ não são citolíticas foi de grande importância à descoberta de que Tregs de murganhos expressam granzima B, esta por sua vez contribui na indução de apoptose de células que atuam na resposta inflamatória, fora isso também foi observado que Tregs deficientes para granzima B expressam função supressora diminuída *in vitro* (SCHMETTERER; NEUNKIRCHNER; PICKL, 2012; SHEVACH, 2009).

3.3.3 Contato célula-célula

Este mecanismo depende do contato das células Treg com as células APCs e necessita da presença de moléculas de superfície, como: CTLA-4 e LAG-3 (SCHMITT; WILLIAMS, 2013). O CTLA-4 é uma molécula com atribuição inibitória que pode atuar por dois mecanismos: de forma direta, através de ligação com elevada afinidade ao receptor de membrana B7 (CD80) expresso em células dendríticas, inibindo a ação de linfócitos T efetores por inibição do sinal co-estimulatório. Em contrapartida pode agir de forma indireta por meio da modulação da função das células apresentadoras de antígeno (APC), atribuindo capacidade tolerogênica (WRIGHT; STAUSS; EHRENSTEIN, 2011). A LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) é uma cadeia polipeptídica expressa em células T CD4⁺, T CD8⁺, Treg e células natural killer (NK) e possui dois mecanismos de atuação: por meio do

contato direto entre as células T reguladoras e as células T efetoras e outro por meio da modulação de APC, sendo que nas duas formas de atuação ocorre através da ligação com MHC de classe II, que inibe a maturação de células dendríticas e, assim, sua capacidade de ativar células T efetoras (CHEN; OPPENHEIM, 2011; READ; POWRIE, 2001).

3.3.4 Distúrbios metabólicos

Este mecanismo pode ser caracterizado por basicamente duas formas de ação: Consumo de IL-2 pelas células T reguladoras, devida sua elevada expressão de CD25, privando as células T efetoras, resultando em apoptose pois este é um fator de crescimento das células T. Em contrapartida o outro mecanismo se dá pela supressão mediada por adenosina que irá inibir as células T efetoras ou ativar o receptor A2 da adenosina (SCHMITT; WILLIAMS, 2013; SHEVACH, 2009). A expressão de CD39 medeia a conversão de ATP para adenosina e AMP e reduz a proliferação de células T efetoras (SINGER et al., 2014).

3.5 Terapia imunomoduladora

Diversos estudos revelam número diminuído de Tregs no sangue periférico de pacientes com distúrbios autoimunes assim, correlacionando que o déficit dessas células se associa ao desenvolvimento da doença. Além do mais, determinadas condições autoimunes modificam a atividade funcional das células T reguladoras, a exemplo na artrite reumatoide e esclerose múltipla (TRZONKOWSKA, M. N., et al. 2014; VALENCIA et al, 2006; VIGLIETTA et al, 2004).

O controle falho das células T convencionais específicas das ilhotas pancreáticas culmina em diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Em uma pesquisa financiada pela JD RF foi possível evidenciar o desequilíbrio entre os dois tipos celulares imunes: Tregs e Teffs. Em pessoas com DM1 as Teffs são abundantes, resultando assim em ineficiente controle das Tregs por sua minoria, impedindo que essas possam restringir as Teffs, que ficam livres para acometer as células beta. Pesquisas anteriores em ratos demonstraram que uma infusão de Tregs pode restaurar o equilíbrio em camundongos (JD RF, 2014).

Em 1975 Gershon propôs o uso terapêutico de Tregs, entretanto a elaboração clínica de protocolos que empregam a imunoterapia com Treg demonstrou ser um desafio, no entanto, ainda assim a infusão terapêutica de células Tregs autólogas ou provenientes de doadores configura uma proposta instigante. *In vivo* uma variedade de estratégias induz o número e potencial de Tregs, tanto a expansão de nTregs quanto a conversão de células T naive em iTregs (JUNE; BLAZAR, 2006). Células T naive são capazes de originar diferentes subtipos

de células efectoras (Th1, Th2 e Th17), que atuam na proteção do organismo contra patógenos, bem como se diferenciar em células T reguladoras, responsáveis por garantir a homeostase imune, isso é possível a partir de estímulos a qual são submetidas, controlada pela expressão de fatores de transcrição distintos (GUPTA et al., 2008; ROMAGNANI et al., 2009; ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009). A conversão de células T CD4 + CD25 – (células T naïve) em iTregs com função supressora representa uma estratégia alternativa para *ex vivo*, através da exposição de células T CD4⁺ CD25⁻ virgens a estimulação antigênica de TGF- β ou IL2 por exemplo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

De maneira geral, os protocolos para imunoterapia exigem isolamento de Treg do hospedeiro ou doador, enriquecimento, expansão e re-infusão (SINGER; KING; ALESSIO, 2014). A maior parte dos estudos pré-clínicos obtém as células Tregs a partir de sangue periférico (SP) ou sangue do cordão umbilical (SCU). No ano de 2006 um estudo pioneiro por Hoffmann et al. descreveram pela primeira vez um procedimento com Boas Práticas de Fabricação (BPF) para o isolamento de células T CD4⁺ CD25⁺ a partir do produto de leucaférese padrão elaborado pela CliniMACS. Esse método foi realizado em dois estágios; em primeiro lugar, depleção de células CD19⁺ e CD8⁺ seguida de um enriquecimento de células que expressam moléculas CD25⁺. Todavia apesar da CliniMACS ter sido amplamente utilizada para isolar Tregs sob as condições BPF, a pureza das células obtidas representa grande limitação. Segundo Di Ianni et al., apenas 80% das células eram FOXP3⁺ devido à presença de contaminantes celulares, como células de linhagem não reguladora, que podem levar a agravar o quadro autoimune (PETERS et al., 2008; PATEL et al., 2015; Di IANNI et al., 2012).

Essa limitação tem dificultado a geração de Tregs antígeno específico para os quais é necessária alta pureza de Tregs. Um método alternativo para o isolamento de Tregs é a purificação baseada em citometria de fluxo, onde as células podem ser isoladas de acordo com a expressão de marcadores celulares selecionados: CD4, CD25 e CD127, oferecendo assim um produto celular altamente puro (>99%) (BRUNSTEIN, 2011).

Devido às limitações encontradas nos métodos existentes, nos últimos anos, diversas empresas tem se empenhado em desenvolver outra metodologia de isolamento compatível com BPF utilizando anticorpos fluorescentes, que irá possibilitar o isolamento de T CD4⁺, CD25⁺, CD45RA⁺, CD127 baixo, um subconjunto mais adequado para expansão de longo prazo em decorrência da estável expressão epigenética de FOXP3, aumentando a resistência a conversão para Th17. Fora isso, esse método evita o isolamento de células T efectoras que

expressam níveis intermediários de CD25, que por sua vez encontram-se aumentadas nas doenças autoimunes (ROMANO, 2019).

Considerando o baixo nível de Tregs presentes no SP ($5-7,5 \times 10^8$) e no SCU ($5-7,5 \times 10^6$) este tem sido outro desafio enfrentado pelos grupos de pesquisa. No sangue periférico as células Tregs representam 5-10% do total de células T CD4⁺ circulantes; embora no timo estejam presentes em maior quantidade, obter a infusão de um grande número de Tregs recém-isoladas tem sido desafiador. Visando aumentar o número de células para infusão um novo protocolo foi desenvolvido, através de ciclos repetidos de estimulação *ex vivo* com esferas anti-CD3 / CD28 na presença de alta dose de IL-2 recombinante humana, favorecendo a expansão policlonal (FRASER et al., 2018). Este protocolo também envolve o uso de rapamicina, que adicionada durante o curso da cultura inibe exclusivamente a proliferação de células T efetoras, além disso a rapamicina favorece a regulação positiva de Foxp3 e a expansão de Tregs *in vivo* e *ex vivo* (THOMSON; TURNQUIST; RAIMONDI, 2009). Essas por sua vez possuem reatividade policlonal devido à estimulação TCR não específica. Em outro protocolo, as Tregs são expandidas na presença de células apresentadoras de antígenos (APCs), estas são mais específicas que as Tregs policlonalmente reativas (GOLSHAYAN et al., 2007; SAGOO et al., 2011), sendo demonstrado em estudos que as Tregs antígeno específico são mais poderosas na supressão de respostas aloimunes *ex vivo* e *in vivo* comparadas com as Tregs expandidas policlonalmente (PUTNAM et al., 2013).

Na última década foram realizados ou iniciados diversos ensaios clínicos de fase I e II que pretendem testar a segurança, eficácia e viabilidade da infusão de Tregs no cenário de órgãos sólidos e autoimunidade (BLUESTONE et al., 2016; VAIKUNTHANATHAN et al., 2017). O primeiro ensaio clínico usando a transferência adotiva de Tregs em pacientes com DM1 de início recente produziram resultados promissores. Oito dos doze pacientes atendidos apresentaram critérios de remissão para a suplementação reduzida de insulina e um paciente se tornou insulina independente (MAREK et al., 2014). Em outro ensaio clínico realizado recentemente (NCT01210664) em pacientes com DM1 confirmou estabilidade de Tregs mais de um ano após a transfusão e melhorou os níveis de peptídeo c nesses pacientes, esses níveis indicam quanta atividade das células beta existe (BLUESTONE et al., 2015). Outro estudo clínico de fase I em andamento (NCT02772679) está avaliando a segurança e a dosagem ideal de uma única infusão de Tregs autólogas policlonais expandidas *ex vivo* (CD4 + CD25 + CD127 baixo), seguida de injeção de IL-2 em pacientes com DM1 (ROMANO et al., 2019). Atualmente, outro ensaio clínico (NCT02428309) de terapia com Treg adotivo no lúpus

eritematoso cutâneo está em andamento (TODO et al., 2016). Além desses supramencionados há outros estudos que foram concluídos ou estão sendo realizados conforme tabela 2.

Até o momento, diversas questões para o uso terapêutico de Tregs em transplantes e autoimunidade permanecem sem resposta. Os resultados obtidos nos ensaios clínicos em curso serão cruciais para melhor compreender a dose de Treg tolerada, o momento da infusão e o regime imunossupressor para preservá-las (ROMANO et al., 2019).

Tabela 2. Ensaios clínicos em andamento adotando Tregs em autoimunidade.

ID do estudo	Estágio	Indicação	Produtos – Tregs expandidas	Status
ISRCTN06128462	I	Diabetes tipo 1	Policlonal autólogo	Concluído
NCT02691247	II	Diabetes tipo 1	Policlonal autólogo	Ativo não recrutando
NCT02772679	I	Diabetes tipo 1	Policlonal autólogo	Recrutamento
NCT02428309	I	Lúpus Cutâneo	Policlonal autólogo	Ativo, não recrutando
NCT03239470	I	Pênfigo	Policlonal autólogo	Recrutando
NCT03011021	I/II	Diabetes tipo 1	Policlonal de SCU	Recrutando
NCT02932826	I/II	Diabetes tipo 1	Policlonal de SCU	Recrutando
NCT02704338	I/II	Hepatite auto- imune	Policlonal autólogo	Desconhecido
NCT03185000	I/II	Doença de Crohn	Tregs ingênuos expandidas policlonal autólogo	Ainda não recrutando

Fonte: Adaptada de ROMANO et al, 2019.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células Tregs demonstraram ser um dos mecanismos principais para regulação da resposta imune, prevenindo a ativação irrestrita do sistema imune, que leva a distúrbios clínicos. Faz-se essencial a indução da tolerância imunológica com o intuito de melhorar condições provocadas pela exacerbada resposta imune, como as autoimunidades. Atualmente os mecanismos disponíveis para induzir a tolerância imunológica incluem farmacoterapias imunossupressoras que culminam na deleção funcional ou anergia de células T convencionais reativas.

Como os Tregs modulam a imunidade inata e adaptativa, a comunidade biomédica desenvolveu um interesse intenso no uso de Tregs para imunoterapia. Atualmente, tem sido

testado diversos métodos diferentes para isolar, preservar, expandir e infundir as Tregs. Embora promissoras, relativamente poucos ensaios clínicos de infusão de células Treg em humanos foram iniciados. Protocolos para manipular populações Treg *in vivo* também foram considerados.

As barreiras à imunoterapia com Treg clinicamente viável incluem estabilidade Treg, efeitos não celulares e demonstração da pureza e potência da preparação celular. Trabalhos futuros precisarão confirmar a segurança da imunoterapia com Treg e estabelecer a eficácia de subgrupos específicos de Treg para o tratamento da doença imunomediada.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; POBER, J. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ARAUJO, J. A. P. et al. Linfócitos T: da imunobiologia aos imunobiológicos. **Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, v. 10, p. 03-19, fev. 2008.
- BACCHETTA R.; GAMBINERI E.; RANCAROLO M. G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. **The Journal of allergy and clinical immunolgy**, St Louis, v. 120, p. 227-235, aug. 2007.
- BACCHETTA R.; GREGORI S.; RANCAROLO M. G. CD4+ regulatory T cells: Mechanisms of induction and effector function. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 4, p. 491-496, may. 2005.
- BENNETT, C. L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nature Genetics**, New York, v. 27, p. 20-21, jan. 2001.
- BLUESTONE, J. A., et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 7, p. 315, nov. 2015.

BRUNKOW, M.E., et al. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature Genetics**, New York, v. 27, p. 68–73, jan 2001.

BRUNSTEIN, C. G., et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. **Blood**, New York, v. 117, p. 1061-1070, jan. 2011.

CHEN, X.; OPPENHEIM, J. J. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 11, p. 1489-1496, oct. 2011.

Di IANNI, M., et al. T regulatory cell separation for clinical application. **Transfusion and Apheresis Science**, Oxford, v. 47, p. 213-216, oct. 2012.

DONS, E. M., et al. Induced regulatory T cells: mechanisms of conversion and suppressive potential. **Human Immunology**, New York, v. 73, p. 328-334, apr. 2012.

FAUSTMAN, D.; DAVIS, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. **Nature reviews Drug Discovery**, London, v. 1, p. 428-493, jun. 2010.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology**, New York, v. 4, p. 330-336, mar. 2003.

FRASER, H., et al. A Rapamycin-based GMP-compatible process for the isolation and expansion of regulatory T cells for clinical trials. **Molecular Therapy Methods Clinical Development**, New York, v. 31, p. 198-209, jan. 2018.

GERSHON, R. K. A disquisition on suppressor T cells. **Transplantation Reviews**, Copenhagen, v. 26, p. 170-185, jul. 1975.

GOLSHAYAN, D., et al. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. **Blood**, New York, v. 109, p. 827-835, jan. 2007.

GORCZYNSKY, R.; STANLEY, J. **Imunologia Clínica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso Editores, 2001.

GUPTA, S. Immune Homeostasis: Regulatory T Cells (Treg) and Molecules. **Clinical Immunology Medical Science**, California, v.28, p. 617-618, nov. 2008.

GUPTA, S., et al. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. **Archivum Immunologiae et therapiarum experimentalis**, Switzerland, v. 2, p. 85-102, mar. 2008.

HOFFMANN, P., et al. Isolation of CD4+ CD25+ regulatory T cells for clinical trials. **Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, Charlottesville, v. 12, p. 267-274, mar. 2009.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, New York, v. 299, p. 1057-1061, feb. 2003.

JDRF. Rebalancing the Immune System. **Clinical trials**, aug. 2014

JONULEIT, H.; SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **Journal of Immunology**, United States, v. 171, p. 6323-6327, dec. 2003.

JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L. F.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 30, p. 531-564, apr. 2012.

JUNE, C. H.; BLAZAR, B. R. Clinical application of expanded CD4+25+ cells. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 18, p. 78-88, apr. 2006.

KHATTRI, R. et al. Na essential role for Scurfin CD4+ CD25+ T regulatory cells. **Nature Immunology**, New York, v. 4, p. 337- 342, mar. 2003.

LA CAVA, A. Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity. **Autoimmunity reviews**, Amsterdam, v. 8, p. 83-87, oct. 2008.

LIAO G.; et al GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. **International Immunology**, Oxford,

LIMA, H. C. Papel das células T reguladoras no desenvolvimento de doenças de pele. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 269-281, jun. 2006.

LONG, S. A.; BUCKNER, J. H. CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. **Jornal of Immunology**, Baltimore, v. 187, p. 2061-2066, sep. 2011.

MAREK, T. N., et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 153, p. 23-30, jul. 2014.

MELLANBY, R. J.; THOMAS, D. C.; LAMB, J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. **Clinical Science**, London, v. 116, p. 639-649, apr. 2009.

NAGLER, A. C. et al. Immune regulatory cells. **Nature Immunology**, New York, v.5, p. 119-122, feb. 2004.

PARHAM, P. **O Sistema Imune**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PATEL, P., et al. Clinical grade isolation of regulatory T cells from G- CSF mobilized peripheral blood improves with initial depletion of monocytes. **American Journal of Blood Research**, Madison, v. 5, p. 79-85, dec. 2015.

PETERS, J. H., et al. Clinical grade Treg: GMP isolation, improvement of purity by CD127 Depletion, Treg expansion, and Treg cryopreservation. **PLoS One**, San Francisco, v.3, sep. 2008.

PETRILLO M. G.; et al. GITR+ regulatory T cells in the treatment of autoimmune diseases. **Autoimmunity reviews**, Amsterdam, v. 14, p. 117-126, feb. 2015.

PUTNAM, A. J., et al. Clinical grade manufacturing of human alloantigen-reactive regulatory T cells for use in transplantation. **American Journal of Transplantation**, Copenhagen, v. 13, p. 3010-3020, nov. 2013.

READ, S.; POWRIE, F. CD4+ regulatory T cells. **Current opinion in immunology**, Philadelphia, v. 13, p. 644- 649, dec. 2001.

ROMAGNANI S. Immunological tolerance and autoimmunity. **Internal and Emergency Medicini**, Rome, v.1, p. 187-196, may. 2006.

ROMANO, M., et al. Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. **Frontiers in immunology**, vol. 10, p. 1-14, jan. 2019.

SAGOO, P., et al. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 3, p. 83, may. 2011.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells. **Springer Seminars in Immunopathology**, New York, v. 28, p. 1-2, aug. 2006.

SAKAGUCHI, S., et al. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. **The Journal of experimental medicine**, New York, v.156, p. 1577-1586, dez. 1982.

SAKAGUCHI, S.; WING K.; YAMAGUCHI T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. **European journal of immunology**, Germany, v. 39, p. 2331–2336, sep. 2009.

SAKAGUCHI, S., et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, Cambridge, v. 133, p. 775-787, may. 2008.

SCHMETTERER K. G.; NEUNKIRCHNER A.; PICKL W. F.M. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 26, p.2253-2276, jun. 2012.

SCHMETTERER, K. G.; NEUNKIRCHNER, A.; PICKL, W. F. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. **FASEB Journal**, United States, v. 26, p. 2253-2276, jun.2012.

SCHMITT, E. G.; WILLIAMS, C. B. Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. **Frontiers Immunology**, Switzerland, v. 4, p. 152, jun. 2013.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of Foxp3(+) T Regulatory Cell-Mediated Suppression. **Immunity**, Cambridge, v. 30, p. 636-645, may. 2009.

SINGER, B. D.; KING, L. S.; D'ALESSIO, F. R. Regulatory T cells as immunotherapy. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v.5, p. 46, feb. 2014.

SINGH, B., et al. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. **Immunological reviews**, Copenhagen, v.182, p. 190-200, ago. 2001.

TAAMS, L. S. et al. Antigen-specific T cell suppression by human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. **European immunology journal**, Weinheim, v.32, p. 1621-1630, mès. 2002.

TAAMS, L. S., et al. Regulatory T cells in human disease and their po-tential for therapeutic manipulation. **Immunology**, England, v. 118, p. 1-9, may. 2006.

THOMSON, A. W.; TURNQUIST, H. R. R.; RAIMONDI, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 9, p. 324-337, may. 2009.

TOBON G. J.; YOUINOU P.; SARAUX A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of autoimmunity**, London, v.35, p. 10-14, aug. 2010.

TODD, S., et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. **Hepatology**, Baltimore, v. 64, p. 632-643, aug. 2016.

TORGERSON, T. R.; OCHS, H. D. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, Hagerstown, v. 7, p. 515-521, dec. 2007.

TRZONKOWSKA, M. N., et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high) CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - Results of one year follow-up. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 153, p. 23-30, jul. 2014.

VAIKUNTHANATHAN, T., et al. Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 189, p. 197-210, aug. 2017.

VALENCIA, X., et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. **Blood**, New York, v. 108, p. 253-261, jul. 2006.

VIGLIETTA, V., et al. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 199, p. 971-979, apr. 2004.

VILLAR, M. D.; HAFLER, D. A. Regulatory T cells in autoimmune disease. **Nature Immunology**, New York, v. 19, p. 665-673, jun. 2018.

WALKER, L. S. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. **Journal of autoimmunity**, London, v. 45, p. 49-57, sep. 2013.

WORKMAN, C. J. et al. The development and function of regulatory T cells. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 16, p. 2603-22, Aug 2009.

WRIGHT, G. P.; STAUSS, H. J.; EHRENSTEIN, M. R. Therapeutic potential of Tregs to treat rheumatoid arthritis. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 23, p. 195-201, jun. 2011.

YAGI, H., et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **International Immunology**, England, v. 16, p. 1643-1656, nov. 2004.

ZHOU, L.; CHONG, M. M.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **Immunity**, Cambridge, v. 30, p. 646-655, may. 2009.